

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Life-Style related Diseases including Cardiovascular Diseases and Diabetes Mellitus

研究開発課題名 : (日本語) 多層オミックス解析による心不全リバーズリモデリングの予測法の開発と予測精度の向上
(英語) Development of Prediction Method for Reverse Remodeling of Heart Failure Based on the Multi-Omics Analysis Technology

研究開発担当者 (日本語) 創薬オミックス解析センター 特任部長・センター長 南野 直人
所属 役職 氏名 : (英語) Omics Research Center, Director, Naoto Minamino

実施期間 : 平成 28 年 10 月 3 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 1 (日本語) 多層オミックス解析に基づく心不全のリバーズリモデリングの予測法の開発基盤の構築

開発課題名 : (英語) Establishment of Basement for Developing the Prediction Method for Reverse Remodeling of Heart Failure by the Multi-Omics Analysis

研究開発分担者 (日本語) 創薬オミックス解析センター 特任部長・センター長 南野 直人
所属 役職 氏名 : (英語) Omics Research Center, Director, Naoto Minamino

分担研究 2 (日本語) 数理解析に基づくリバーズリモデリング予測法の作成

開発課題名 : (英語) Development of the Prediction Method for Reverse Remodeling of Failing Heart by Mathematical Analysis

研究開発分担者 (日本語) 創薬オミックス解析センター 室長 高橋 篤
所属 役職 氏名 : (英語) Omics Research Center, Laboratory Chief, Atsushi Takahashi

分担研究3 (日本語) 多層オミックス解析の実施
開発課題名: (英語) Implementation of Multi-Omics Analyses of Myocardial Tissues

研究開発分担者 (日本語) 研究所 分子生物学部 室長 白井 学
所属 役職 氏名: (英語) Research Institute, Department of Bioscience and Genetics,
Laboratory Chief, Manabu Shirai

分担研究4 (日本語) リバースリモデリングの評価・予測法の検証
開発課題名: (英語) Evaluation of Reverse Remodeling of Failing Heart and Validation of
the Prediction Method for Reverse Remodeling

研究開発分担者 (日本語) 病院移植医療部 部長 福嶋 教偉
所属 役職 氏名: (英語) Department of Transplant Medicine, Director, Norihide Fukushima

II. 成果の概要 (総括研究報告)

左心室補助人工心臓 (LVAD) を装着した重症心不全患者の一部において、心筋組織にリバースリモデリングが起り、心機能の安定的回復に至る症例が認められる。心不全に対する抜本的な治療法が無いため、この現象を正確に理解、活用することが疾患克服のために不可欠である。本研究では、南野直人センター長、高橋篤室長 (国立循環器病研究センター 創薬オミックス解析センター)、白井学室長 (同センター研究所分子生物学部)、福嶋教偉部長 (同センター病院移植医療部) からなる研究グループを結成し、LVAD を装着した際に摘出された心筋組織について、プロテオーム、トランスクリプトーム、エピゲノムの多層オミックス解析を行い、得られた解析情報の数値情報解析より、LVAD 装着により当該患者の心臓にリバースリモデリングが起り機能的な回復に至るかどうかを予測する方法を作成した。併せてリバースリモデリングの診断基準の設定、心不全病態を評価するバイオマーカー等の探索を進め、心不全におけるリバースリモデリング研究を推進する分子情報基盤を構築した。

超高齢化社会を迎える我が国では、近い将来に心不全患者の急増が予測され、その治療法の開発が喫緊の課題である。心不全は循環器疾患における最大の課題で、5年生存率は70%程度と低く、入退院を繰り返し重症化する例が大半である。その中で心臓の機能低下や線維化 (リモデリング) が回復 (リバース) し、心機能の安定的回復に至る「リバースリモデリング」が、LVAD などの非薬物療法、 β ブロッカーやアンジオテンシン受容体ブロッカーなどの薬物療法により、低率ではあるが起こるため、心不全の治療法開発や創薬にはリバースリモデリングの分子機序解明が不可欠と考えられている。

本研究では LVAD 装着術を受けた 50 例の重症心不全患者の摘出心筋組織について、プロテオーム、トランスクリプトーム、エピゲノム (メチローム) の多層オミックス解析を行った。この内、リバースリモデリングにより心機能の安定的回復に至った回復群 4 症例、回復が認められない非回復群の 45 症例 (病理診断より 1 例を除外) について、本研究で得られたオミックス解析情報と心エコー検査をはじめとする心機能検査、血液検査、病理所見などの臨床情報を比較・解析した。トランスクリプトーム解析では RNA-seq 法により 1.2 億リード以上の高密度の解析情報、メチローム解析では 85 万 CpG サイトのメチル化率、

プロテオーム解析では 2000 タンパク質の発現情報を入手した。これらの解析結果を LVAD 装着による回復群と非回復群で比較し、両群を区別することができるタンパク質、mRNA、メチル化サイトを数多く同定した。それらの中より、両群を識別するのに適切なタンパク質、mRNA、メチル化サイトを数理情報解析により選択し、LVAD 装着時の特定 3 遺伝子のメチル化率、mRNA 及びタンパク質の発現量を用いて、回復群を高精度に予測する方法を作成した。また、mRNA 発現量（10 種程度）、あるいはメチル化率（10 サイト程度）に基づく心機能回復の予測法も作成した。先行研究で実施した心臓移植症例の多層オミックス解析データなども用いて、作成した予測法の検証を行った結果、満足すべき予測結果が得られた。今後はさらに多様な分子情報を組み合わせ、予測法の改良を進める。

得られた解析情報を用いて、心不全の重症度や回復率、線維化率などの診断指標となるバイオマーカーの探索も進めた。各臨床情報に相関する数多くの mRNA、メチル化率、タンパク質の候補分子が得られ、臨床応用の視点より、高精度で血液において評価可能な分子にも着目して探索を行った。

本研究により膨大なタンパク質、RNA、DNA メチル化に関する情報が収集でき、リバースリモデリングの予測法や分子診断基準の設定、並びに重症度や予後の診断に用いるバイオマーカーなどの発見を可能とする生体分子情報基盤を確立できた。今後は本研究の成果を発展させ、心不全の回復に至るリバースリモデリングの分子経路の同定に努め、それらを活用して予測法の精度向上を図り、創薬標的分子の同定などを推進する。

成果の概要（総括研究報告：英文）

Heart failure is one of the main critical diseases to be resolved in the cardiovascular field, and its 5 year mortality rate is as high as 30%. Since there is no effective treatment to prevent its progression and to restore cardiac function, our country will have extremely high rates of heart failure patients near in future. Heart transplantation and implantation of left ventricular assist device (LVAD) are few available therapies for severe heart failure until today, in addition to intensive drug therapy with angiotensin receptor blocker and beta-blocker. In about 10% patients who received the LVAD implantation, the phenomenon called “reverse remodeling” occurs in the myocardial tissue, which stably recovers cardiac function, and reduces ventricular diameter, morphological deformation, and fibrosis. However, molecular mechanism and definition of the cardiac reverse remodeling still remains unclear.

In this project for development of prediction method for LVAD-induced reverse remodeling of failing heart, myocardial tissues dissected from left ventricles of 50 patients at the time of LVAD implantation were subjected to multi-omics analysis to determine their molecular profiles of DNA methylation, mRNA and protein expression. Using the omics analysis data and clinical data periodically collected before and after the LVAD implantation, we mathematically analyzed and identified a series of molecules characteristic to reverse remodeling of failing heart. Then, several algorithms were developed by combining the expression levels of selected proteins and mRNAs, and DNA methylation ratios at specific CpG sites to predict the recovery rates from severe heart failure by the cardiac reverse remodeling. These prediction methods were validated by the multi-omics analysis data previously performed for the comparable patient group, and were concluded to be satisfactory for this purpose.

Molecular diagnostic criteria for the reverse remodeling were searched by comparing clinical data and omics analysis data of myocardial tissues from the same patients between LVAD implantation and heart transplantation. We also searched for new biomarkers usable for evaluating severity and prognosis of the heart failure by maximally utilizing these omics analysis data. Since it is preferable to find the biomarkers measurable in the blood samples, we narrowed down and selected candidates from the viewpoint of their organ-specificity, expression level, dynamic range, and secretory nature. We are planning to evaluate several candidates by measuring their levels in the plasma samples collected before and after the LVAD implantation.

In the present study, big omics data with high quality for heart failure and reverse remodeling were accumulated in the database. The stored information is expected to promote drug discovery, development of diagnostic and treatment methods by identifying their target molecules through elucidating the molecular pathways of progression and reverse remodeling of heart failure.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 8件）

1. Nagai-Okatani C, Kangawa K, Minamino N. Three molecular forms of atrial natriuretic peptides: quantitative analysis and biological characterization. *J Pept Sci*. 2017, in press. doi: 10.1002/psc.2969.
2. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Fujishima A, Oka S, Tsutamoto T, Kinoshita H, Nakao K, Cho K, Inazumi H, Okamoto H, Nishida M, Kato T, Fukushima H, Yamashita JK, Wijnen WJ, Creemers EE, Kangawa K, Minamino N, Nakao K, Kimura T. MiR30 GALNT1/2 Axis-Mediated Glycosylation Contributes to the Increased Secretion of Inactive Human Prohormone for Brain Natriuretic Peptide (proBNP) From Failing Hearts. *J Am Heart Assoc*. 2017, 6, e003601.
3. Nakao K, Kuwahara K, Nishikimi T, Nakagawa Y, Kinoshita H, Minami T, Kuwabara Y, Yamada C, Yamada Y, Tokudome T, Nagai-Okatani C, Minamino N, Nakao YM, Yasuno S, Ueshima K, Sone M, Kimura T, Kangawa K, Nakao K. Endothelium-Derived C-Type Natriuretic Peptide Contributes to Blood Pressure Regulation by Maintaining Endothelial Integrity. *Hypertension*. 2017, 69, 286-296.
4. Namkoong C, Toshinai K, Waise TM, Sakoda H, Sasaki K, Ueta Y, Kim MS, Minamino N, Nakazato M. NERP-2 regulates gastric acid secretion and gastric emptying via the orexin pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017, 485, 409-413.
5. Fukushima N, Ono M, Saiki Y, Sawa Y, Nunoda S, Isobe M. Registry Report on Heart Transplantation in Japan (June 2016). *Circ J*. 2017, 81, 298-303.
6. Ishibashi-Ueda H, Matsuyama TA, Ohta-Ogo K, Ikeda Y. Significance and Value of Endomyocardial Biopsy Based on Our Own Experience. *Circ J*. 2017, 81, 417-426.
7. Nishigori M, Yagi H, Mochiduki A, Minamino N. Multi-omics approach to identify novel biomarkers for dilated cardiomyopathy: Proteome and transcriptome analyses of 4C30 dilated cardiomyopathy mouse model. *Biopolymers*. 2016, 106, 491-502.

8. Kakuta T, Hoashi T, Sakaguchi H, Kagisaki K, Negishi J, Shimada M, Tsuda E, Shiraishi I, Fukushima N, Ichikawa H. Early Single Institutional Experience of Berlin Heart EXCOR(®) Pediatric Ventricular Assist Device in Japan. Circ J. 2016, 80, 2552-2554.
9. 錦織充広, 南野直人. バイオマーカー探索とバイオバンクの役割. 臨床化学, 2016, 45, 341-347.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし